



## **TEKNIikka JA LIIKENNE**

### **Laboratorioala**

## **OPINNÄYTETYÖ**

### **METSÄMAAN MIKROBIEN MOLEKYYLIBIOLOGINEN TUNNISTUS DENATUROIVAN GEELIELEKTROFOREESIN (DGGE) AVULLA**

**Työn tekijä: Niina Järvinen  
Työn ohjaajat: Jarmo Palm  
Jukka Kurola**

**Työ hyväksytty: \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . 2010**

**Jarmo Palm  
lehtori**



## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Bio- ja ympäristötieteellisen tiedekunnan Ympäristötieteiden laitoksella Lahdessa. Haluan kiittää FT Jukka Kurolaa ja FM Jarmo Palmia hyvästä ohjauksesta ja neuvoista sekä professori Rauni Strömmeriä mahdollisuudesta toteuttaa työ. Lisäksi haluan kiittää läheisiäni sekä erityisesti Juhoa tuesta ja ymmärryksestä työn tekemisen aikana.

Espoossa 15.11.2010

Niina Järvinen

## TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Niina Järvinen	
<b>Työn nimi:</b> Metsämaan mikrobien molekyylibiologinen tunnistus denaturoivan geielektroforeesin (DGGE) avulla.	
<b>Päivämäärä:</b> 15.11.2010	<b>Sivumäärä:</b> 44 s.
<b>Koulutusohjelma:</b>  Laboratorioala	
<b>Työn ohjaaja:</b> FM Jarmo Palm  <b>Työn ohjaaja:</b> FT Jukka Kurola	
<p>Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia metsämaan humusnäytteiden mikrobilajistoa molekyylibiologisin menetelmin. Työ toteutettiin Helsingin yliopiston Ympäristötieteiden laitoksella Lahdessa. Humusnäytteet olivat pitkäaikaisesta lannoituskokeesta, jossa maaperää oli lannoitettu typellä, tuhalla sekä niiden yhdistelmällä. Työn tarkoituksena oli tarkastella, vaikuttavatko eri lannoituskäsittelyt maaperän mikrobilajistoon. Tutkitut mikrobiryhmät olivat sienet, bakteerit ja ammoniakkia hapettavat bakteerit (AOB).</p> <p>Metsämaan humuksesta eristetyistä DNA-näytteistä tunnistettiin sienet monistamalla polymeerasiketjureaktiolla (PCR) sienten 18S rDNA -merkkigeenin ITS-aluetta. Bakteerit tunnistettiin monistamalla 16S rDNA -merkkigeeniä. AOB:t tunnistettiin monistamalla 16S rDNA -merkkigeeniä <math>\beta</math>-proteobakteereille selektiivisillä alukkeilla nested PCR -menetelmällä. Monistetut PCR-tuotteet eroteltiin denaturoivalla gradientti geielektroforeesilla (DGGE). Erotetut DNA-jaksot monistettiin uudestaan ja sekvensoitiin Biotekniikan Instituutissa Helsingissä. Sekvenssit tulkittiin bioinformatiikan työkalujen avulla.</p> <p>Kaikkien metsämaan mikrobiryhmien DGGE-analyseissä onnistuttiin sekvensoimaan ja tunnistamaan eri fylyttyppejä. Parhaat tulokset saavutettiin sienten osalta. Bakteerien ja AOB:n osalta menetelmät kaipaavat vielä optimointia humusmaanäytteitä varten.</p> <p>Metsämaan mikrobilajistoissa havaittiin eroja eri lannoituskäsittelyiden välillä. Suurimmat erot olivat sieni- ja AOB-lajistoissa, joilla lajistot olivat kaikissa käsittelyissä erilaiset. Tulosten perusteella sieni- ja AOB-lajistot ovat herkimpiä lannoituskäsittelyiden vaikutuksille. Vähiten eroja lannoituskäsittelyiden kesken oli bakteerilajistossa.</p>	
<b>Avainsanat:</b> Humus, DGGE, sekvenssi	

## ABSTRACT

**Name:** Niina Järvinen

**Title:** Identifying microbial fauna in forest humus soil by using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

**Date:** 15 November 2010

**Number of pages:** 44

**Department:**  
Laboratory Sciences

**Instructor:** M. Sc. Jarmo Palm

**Supervisor:** Ph.D Jukka Kurola

The aim of this graduate study was to analyze the microbial fauna in forest humus soil by using molecule biological methods. The study was carried out at the University of Helsinki, Department of Environmental Sciences in Lahti, Finland. The Soil samples were taken from a long-term fertilization experiment in which soil was fertilized with nitrogen, ash and a combination of those two. The purpose was to examine the effect of different fertilization treatments on soil microbial fauna. The studied microbial groups were fungi, bacteria and ammonia oxidizing bacteria (AOB).

The Fungi were identified from soil DNA samples by multiplying ITS-region of 18S rDNA gene with polymerase chain reaction (PCR). The Bacteria were identified by multiplying 16S rDNA gene. AOB were identified by multiplying 16S rDNA gene with nested PCR-method using primers selective to  $\beta$ -proteobacteria. PCR-products were separated with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). DNA was multiplied again and sequenced in The Institute of Biotechnology in Helsinki, Finland. The Sequences were interpreted with bioinformatics tools.

DGGE-analyses for all three microbial groups were implemented successfully. Fylotypes from all three microbial groups were sequenced and identified. The Best results were achieved by the fungi. The Methods for analysing bacteria and AOB still require optimization.

Differences between the fertilization treatments were observed. The main differences were detected in fungi and AOB fauna. According to the results, the fungi and AOB fauna are the most sensitive for fertilization treatments, whereas the differences were the least in bacteria fauna.

**Keywords:** humus, DGGE, sequence

## SISÄLLYS

### ALKULAUSE

### TIIVISTELMÄ

### ABSTRACT

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MAAPERÄ JA SEN MIKROBIT</b>	<b>2</b>
2.1	Humusmaan ominaisuuksia .....	2
2.2	Maaperän mikrobit .....	2
2.2.1	<i>Sienet</i> .....	2
2.2.2	<i>Bakteerit</i> .....	4
2.2.3	<i>Ammoniakkia hapettavat bakteerit (AOB)</i> .....	6
<b>3</b>	<b>MOLEKYYLIBIOLOGISET SORMENJÄLKIANALYYSIT</b>	<b>7</b>
3.1	Denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi (DGGE) .....	7
3.2	Muita sormenjälkianalyysejä .....	9
<b>4</b>	<b>AINEISTOT JA MENETELMÄT</b>	<b>9</b>
4.1	Näytteet.....	9
4.2	PCR-monistusreaktiot.....	10
4.2.1	<i>Sienten ITS-alueiden monistus humusnäytteistä</i> .....	10
4.2.2	<i>Bakteerien 16S rDNA -merkkigeenin monistus humusnäytteistä</i> .....	12
4.2.3	<i>AOB:n 16S rDNA -merkkigeenin monistus humusnäytteistä</i> .....	13
4.3	DGGE-analyysit ja PCR-monistusreaktiot DGGE:n jälkeen.....	15
4.3.1	<i>Sienten DGGE-analyysi ja DNA:n monistus</i> .....	15
4.3.2	<i>Bakteerien DGGE-analyysi ja DNA:n monistus</i> .....	17
4.3.3	<i>AOB:n DGGE-analyysi ja DNA:n monistus</i> .....	18
4.4	Sekvensointi, sekvenssien tulkinta ja sormenjälkianalyysit .....	19
<b>5</b>	<b>TULOKSET</b>	<b>21</b>
5.1	Sienten ITS-alueen monistus, DGGE-analyysi ja sekvensointi.....	21
5.2	Bakteerien 16S rDNA -merkkigeenin monistus, DGGE-analyysi ja sekvensointi .....	25
5.3	AOB:n 16S rDNA -merkkigeenin monistus, DGGE-analyysi ja sekvensointi .....	27

<b>6</b>	<b>TULOSTEN TULKINTA</b>	<b>31</b>
6.1	Sienet .....	31
6.2	Bakteerit.....	33
6.3	Ammoniakkia hapettavat bakteerit (AOB) .....	34
<b>7</b>	<b>PÄÄTELMÄT</b>	<b>35</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>36</b>

## 1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia metsämaan humusnäytteiden mikrobilajistoa molekyylibiologisin menetelmin. Humusnäytteet olivat pitkäaikaisesta lannoituskokeesta, jossa maaperää oli lannoitettu typellä, tuhalla sekä niiden yhdistelmällä. Työn tarkoituksena oli tarkastella, vaikuttavatko eri lannoituskäsittelyt maaperän mikrobilajistoon.

Opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yliopiston Ympäristötieteiden laitoksella Lahdessa Nitrifikaatio – prosessit ja organismit (Processes and organisms in nitrification) nimisessä tutkimushankkeessa. Hankkeen päätavoitteita ovat nitrifikaation sekä ammoniakkia hapettavien mikrobien ja niiden toiminnallisten geenien tutkiminen erilaisissa maaperänäytteissä kuten pelto- ja metsämaassa. Prosessien ja organismien samanaikainen tutkiminen auttaa paremmin ymmärtämään typen kiertoon liittyviä mekanismeja maaperässä. [1.]

Puutuhkaa on käytetty pohjoisilla metsämailla lannoitukseen ja estämään happamoitumista. Havumetsässä suositellaan käytettäväksi sekä tuhkaa että typpilannoitetta puiden kasvun edistämiseksi. Tuhka lisää maaperän pH:ta ja sen vaikutus kestää useita vuosia. Tämä johtaa yleensä mikrobibiomassan kasvuun, maahengitykseen ja orgaanisen aineksen mineralisaatioon. Kasvanut mikrobiaktiivisuus ja mineralisaatio voivat olla hyödyllisiä puiden kasvulle, mutta lisäävät myös riskiä typenhukkaan, varsinkin jos typen lisäyksen lähde on ollut typpilannoite. Lisäksi tuhka ja typpilannoitus voivat vaikuttaa mikrobiologisiin prosesseihin tuottamalla tai kuluttamalla kasvihuonekaasuja: metaania ( $\text{CH}_4$ ), dityppioksidia ( $\text{N}_2\text{O}$ ) ja hiilidioksidia ( $\text{CO}_2$ ). [2, s. 2 ja 3, s. 151–152.]

## 2 MAAPERÄ JA SEN MIKROBIT

### 2.1 Humusmaan ominaisuuksia

Maaperä muodostuu erikokoisista, -muotoisista ja erilaisen kemiallisen koostumuksen omaavista mineraalipartikkeleista sekä orgaanisesta aineksesta kuten kasvien juurista ja mikrobipopulaatiosta. Kaasut, vesi ja liuenneet mineraalit täydentävät maaperän koostumusta. Maaperän koostumukseen vaikuttavat myös fysikaaliset voimat kuten kuivuminen ja jäätyminen. [4, s. 13.]

Maaperän humus on osittain hajonnutta orgaanista ainesta, jota esiintyy kivennäismailla. Humustyyppejä on kolme: kangashumus, mullas ja multa. Suomalaisessa kangashumuksessa on niukasti maaeläimiä ja sienet toimivat pääasiallisina hajottajina. Pintakasvillisuudessa esiintyy sammalia, jäkäliä ja varpuja. Kangashumus on tyypillinen havumetsien humustyyppi. Mullas on Suomessa tyypillinen viljavien kivennäismaiden ja multa lehtometsien humustyyppi. [5.]

### 2.2 Maaperän mikrobit

#### 2.2.1 Sienet

Sienet ovat eukaryootteja eli aitotumallisia, toisenvaraisia eliöitä, jotka saavat tarvitsemansa energian hajottamalla kuollutta ainesta tai loisimalla. Siten sienillä on suuri merkitys ekosysteemissä hajottajina sekä kasvien ja eläinten symbionteina. Niitä hyödynnetään myös eri teollisuuden aloilla. [6.]

Saprofyytit ovat sieniä, jotka elävät kuolleella orgaanisella aineksella. Ne hajottavat esimerkiksi selluloosaa, hemiselluloosaa ja pektiiniä vapauttaen samalla kivennäisaineita kasvien käyttöön. Nekrotrofit sienet tappavat isäntäeliönsä entsyymien avulla ja käyttävät sitten kuollutta solukkoa ravintonaan. Biotrofit sienet hyödyntävät puolestaan elävää organismia, eli elävät symbioosissa tämän kanssa tai loisivat, jos isäntäeliölle on sienestä haittaa. Esimerkki sienen ja kasvin välisestä symbioosista on sienijuuri eli mykorritsa, joka on yli 80 %:lla kasvilajeista. Mykorritsasieni kuljettaa kasville ravinteita ja vettä parantaen siten kasvin kasvua ja lisääntymistä. Sieni saa puolestaan kasvilta hiilihydraatteja. Mykorritsallinen kasvi on yleensä



kilpailukykyisempi ja kestää paremmin ympäristön stressiä kuin kasvi, jolla sienijuurta ei ole. [7, s. 149–152, 263.]

Sienet voivat lisääntyä sekä suvullisesti että suvuttomasti. Osalla sienistä voi olla molempia elomuotoja. Sienten lisääntyminen tapahtuu itiöiden avulla. Suvuttomat itiöt voivat syntyä esimerkiksi kuroutumalla sienirihman haaran päästä. Itiöt leviävät tuulen mukana ja itävät sopivalla kasvualustalla kärjestään. Suvullisten itiöiden syntyminen voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: plasmogamia-, karyogamia- ja meioosi -vaiheisiin. [7, s.148–149.]

Sienet voivat olla yksisoluisia, jolloin niitä kutsutaan yleensä yleisnimellä hiivoiksi. Sienisolua ympäröi kitiinistä muodostuva soluseinä. Soluseinän ja -kalvon sisällä ovat soluelimet, jotka ovat vastaavat kuin kasveilla tai eläimillä. Yksisoluinen sieni voi olla myös rihmamainen. Sienirihmasto koostuu peräkkäisistä sienisolusta, jotka ovat yhteydessä väliseinässä olevan reiän kautta. Rihma voi kasvaa päästään ja haarautua niin kauan, kuin sopivia ravinteita on saatavilla. Rihmasto voikin ulottua suurille, jopa hehtaarien kokoisille alueille. Lisäksi monet rihmastolliset sienet kasvattavat maanpäällisen itiöemän, joka on niiden suvullinen lisääntymisrakenne. [7, s. 145–146, 148.]

Varsinaiset aitosienet voidaan jakaa pääjaksoihin, joita ovat piiskasiimasienet (chytridiomycota), yhtymäsienet (zygomycota), kotelosienet (ascomycota) ja kantasienet (basidiomycota). Piiskasiimasienet ovat mikroskooppisia sieniä, jotka liikkuvat siimojen avulla. Osa on loisia tai saprofyyttejä. Myös yhtymäsienistä osa on saprofyyttejä tai hyönteisten loisia. Kotelosienet ovat sienten suurin pääjakso, johon kuuluu noin 30 000 lajia. Kotelosienillä on itiökotelo (ascus), jossa itiöt syntyvät. Kotelosienet voivat olla saprofyyttejä, kasvipatogeenejä, mykorritsasieniä tai loisia. Osa lajeista on tärkeä osa elintarvike- tai lääketieteellisuutta. Osa puolestaan muodostaa symbioosin levän kanssa, eli ne ovat sieniosakkaina jäkälässä. Kantasienet ovat maanpäällisiä sieniä, joita esiintyy monissa eri ympäristöissä. Ne voivat olla saprofyyttejä, patogeenejä, hiivamaisia sieniä tai ektomykorritsasieniä eli symbioosissa puiden kanssa. Suurin osa ruokasienistä kuuluu kantasieniin. [7, s. 144–145.]

### 2.2.2 Bakteerit

Bakteerit ovat yksisoluisia organismeja eli prokaryootteja, jotka ovat yleensä halkaisijaltaan 0,2 - 2 µm ja pituudeltaan 1 - 10 µm. Bakteerien pieni koko ja yksinkertainen rakenne mahdollistaa niiden kasvun ja sopeutumisen erilaisiin ympäristöihin. Tyypillisimmät muodot maaperäbakteereilla ovat sauvamaiset basillit, pyöreät kokit, spiraalimaiset spirillit ja haaroittuvat aktinomykeetit. Yksittäiset solut voivat muodostaa suurempia kokonaisuuksia, kuten kokkien muodostama jono eli streptokokki. [7, s. 105–106.]

Bakteerien rakenteeseen kuuluu solukalvon ympäröimä solulima, jossa DNA on vapaana yhtenä molekyylinä, nukleoidina. Solukalvoa ympäröi usein soluseinä sekä erilaiset tarttumis- tai liikuntaelimet. Bakteerien ulkopintaa peittää usein polysakkarideista tai glykoproteiineista koostuva kerros, joka voi olla ohut limakerros tai paksu kapseli. Kapselirakenne suojaa bakteeria, mutta sillä on myös merkittävä rooli maaperän eri partikkelien sitojana ja rakenteen luojana sekä biofilmin muodostumisessa. [7, s. 105–106, 116.]

Bakteerien nukleoidi sisältää bakteerien kromosomin, joka on suuri, kaksijuosteinen DNA-molekyyli. Se sisältää kaiken tiedon, jota bakteeri tarvitsee kasvuun ja lisääntymiseensä. Useimmilla bakteereilla on lisäksi pieniä, pyöreitä DNA-molekyyliä eli plasmideja, jotka sisältävät vähemmän tietoa kuin kromosomaalinen DNA. Plasmidien sisältämä informaatio voi liittyä esimerkiksi bakteerin kykyyn sietää antibiootteja tai tuottaa myrkyllisiä aineita. Plasmidit monistuvat itsenäisesti ja pystyvät siirtymään eri bakteerisolujen välillä siirtäen samalla eri ominaisuuksia solusta toiseen. [7, s. 115.]

Maaperän bakteerit ovat aineenvaihdunnaltaan monipuolisia. Suurin osa on heterotrofisia, osa autotrofisia ja osa pystyy muuttamaan metaboliaansa ympäristön olosuhteiden mukaan (mixotrofit). Autotrofi on energian tuotannossaan omavarainen, eli se käyttää hiilen lähteenä hiilidioksidia. Heterotrofi puolestaan tarvitsee orgaanisia yhdisteitä hiilen lähteeksi. Kemoautotrofit hapettavat epäorgaanisia yhdisteitä eli niiden energian lähteenä voi toimia esimerkiksi ammoniakki, nitriitti-ioni tai vetykaasu. Kemoautotrofit ovatkin tärkeitä tekijöitä esimerkiksi typen kierrossa.

Bakteerien päätehtävä maaperässä on toimia hajottajina, ja tehokkainta hajotus on hapen läsnä ollessa. Anaerobinen hajotus on hitaampaa kuin aerobinen ja tuottaa sivutuotteena metaania. [7, s. 119–125.]

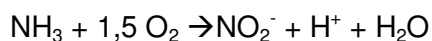
Osa maaperäbakteereista kuten *Bacillus*- ja *Clostridium* -sukujen edustajat, kykenee itiöiden muodostukseen. Itiöt eivät kasva eikä niiden aineenvaihdunta toimi, mutta niiden avulla bakteerit kykenevät selviytymään epäedullisista olosuhteista, kuten ravinteiden puutteesta, korkeasta lämpötilasta tai kuivuudesta. Kun olosuhteet muuttuvat paremmiksi, itiö itää ja kasvullinen solu murtautuu itiön sisältä. [7, s. 116.]

Suurin osa maaperän bakteereista viihtyy maaperän ravinnerikkaissa pintakerroksissa 20 - 35 °C:n lämpötilassa. Toisaalta bakteereita esiintyy myös äärimmäisissä olosuhteissa. Esimerkiksi termofiiliset bakteerit viihtyvät parhaiten 42 - 50 °C:ssa ja hypertermofiiliset jopa 80 - 100 °C:ssa. Lämmönsietokyky perustuu usein lämpöä kestävien proteiinien tuottamiseen sekä tyydyttyneiden rasvahappojen suureen määrään bakteerin solukalvossa. Psykrofiilit ovat bakteereita, jotka viihtyvät matalissa, alle 15 °C:n lämpötiloissa. Psykrofiilit mikrobit tuottavat usein kylmässä toimivia entsyymeitä ja niiden solukalvossa on paljon tyydyttymättömiä rasvahappoja. Asidofiilit bakteerit pystyvät sietämään matalaa pH:ta ja alkalifiilit bakteerit puolestaan korkeaa pH:ta. Sietokyky johtuu usein ionipumppujen toiminnasta. Aktinomykeetit kestävät usein korkeaa pH:ta ja happamuuden vaihtelu maaperässä vaikuttaa helposti sen lajiston tasapainoon. Osmotolerantit bakteerit sietävät korkeita suolapitoisuuksia ja halofiilit jopa tarvitsevat korkean NaCl-pitoisuuden elääkseen. [7, s. 123–124.]

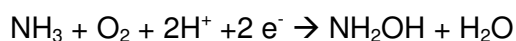
### 2.2.3 Ammoniakkia hapettavat bakteerit (AOB)

Nitrifioivia ja ammoniakkia hapettavia bakteereita on kaikkialla maaperässä, makeissa vesissä ja merissä. Nitrifioivien bakteerien aineenvaihdunta on ainutlaatuinen, ja monia siinä esiintyviä entsyymeitä ei ole löydetty muualta. [8, s. 674.]

Nitrifikaatio on kaksivaiheinen prosessi, johon osallistuvat ammoniakkia hapettavat bakteerit (AOB) ja nitriittiä hapettavat bakteerit (NOB). AOB:t hapettavat ammoniakin nitriitiksi ja NOB:t hapettavat nitriitin nitraatiksi. [8, s. 674.] Ammoniakin hapettaminen nitriitiksi tapahtuu seuraavan reaktioyhtälön mukaan:



Reaktio tapahtuu kahdessa vaiheessa, joista ensimmäisessä ammoniakki muutetaan hydroksyyliamiiniksi entsyymien avulla:



Hydroksyyliamiinin muutos nitriitiksi tapahtuu usean vaiheen kautta kokonaisreaktion ollessa seuraava:



Ammoniakin hapetus happamoittaa maaperää, sillä reaktio tuottaa aina vetyä. Yleensä AOB:t viihtyvät kuitenkin neutraalissa ympäristössä ja niiden toiminta häiriintyy matalassa pH:ssa. [7, s. 347–348.]

AOB:t kuuluvat muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta  $\beta$ -proteobakteerien luokkaan.  $\beta$ -proteobakteereihin kuuluvia sukuja ovat *Nitrosospira* ja *Nitrosomonas*. Suvut voidaan jakaa edelleen seitsemään eri ryhmään niiden 16S rDNA -geenin sekvenssin perusteella. Ryhmät 1, 2, 3 ja 4 edustavat *Nitrosospira*-sukua ja ryhmät 5, 6 ja 7 *Nitrosomonas*-sukua. Ryhmät 2, 3, 4 ja 6 ovat tyypillisimpiä maatalousmaasta, ruohomaasta ja metsämaasta löydettyjä AOB-sekvenssejä. [9, s. 34.]

### 3 MOLEKYYLIBIOLOGISET SORMENJÄLKIANALYYSIT

Molekyylibiologisia sormenjälkianalyyseja voidaan käyttää mikrobien tunnistamiseen niiden geneettisen sormenjäljen perusteella. Analyysit perustuvat DNA-koostumuksen erottelemiseen ja etenevät usein samalla tavalla: ensin näytteen DNA eristetään, tarkasteltava merkkigeeni monistetaan polymeerasiketjureaktiolla (PCR) ja monistustuote analysoidaan sormenjälkianalyysillä. Sormenjälkitekniikoita ovat esimerkiksi denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi (DGGE) ja pulssikenttägeelielektroforeesi (PFGE). [10.]

Maaperästä voidaan eristää sekä DNA:ta että RNA:ta. DNA:n eristäminen on helpompaa kuin RNA:n sen paremman pysyvyyden takia. Eristykseen tarvitaan harvoin suurta määrää maata. Koska maaperä on luonnostaan hyvin heterogeenistä, kerätään näytteitä kuitenkin yleensä usealta alueelta ja niitä yhdistetään myöhemmin kattavan näytteen saamiseksi. [11.]

#### 3.1 Denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi (DGGE)

Denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi (DGGE) on tekniikka, jonka avulla pystytään erottamaan samankokoiset mutta erilaisen emäskoostumuksen omaavat DNA-jaksot toisistaan. Samankokoiset jaksot saadaan aikaan PCR-reaktiolla monistamalla haluttu kohde- tai merkkigeeni kuten bakteerien 16S rDNA. DGGE:ssä käytettävä geeli sisältää eri pitoisuuden denaturoivaa ureaa ja formamidia geelin ylä- ja alapäässä. Mikrobin DNA:n emäskoostumus määrää, kuinka paljon denaturoivia aineita tarvitaan kaksijuosteisen DNA:n hajottamiseksi. Emäspari A-T on sitoutunut toisiinsa kahdella vetysidoksella ja C-G kolmella vetysidoksella, jolloin se on vaikeampi saada hajoamaan. Koko ketjun hajoaminen estetään käyttämällä PCR-aluketta, jonka toisessa päässä on ns. GC-häntä eli runsaasti sytosiinia ja guaniinia sisältävä DNA-jakso. DGGE-analyysin tuloksena saadaan näytteen geneettinen profiili, jossa juovan sijainti kertoo mikrobiryhmän eri populaatioista ja juovan intensiteetti epäsuorasti populaation runsaudesta. [11.]

DGGE-geeli valmistetaan yhdistämällä kaksi liuosta, joissa denaturoivien kemikaalien (urea ja formamidi) määrä on erilainen. Liuokset sisältävät akryyliamidia geelin rakennusaineena. TEMED (N,N,N',N'-tetrametyleenidiamiini) ja APS (10 % ammoniumpersulfaattiliuos) saavat geelin jähmettymään. Geeli valetaan pystysuunnassa kahden lasilevyn väliin gradienttipyörän avulla (kuva 1). Valettuun geeliin lisätään kampa ja geelin annetaan jähmettyä vähintään kaksi tuntia. Geeli ajetaan ajolaitteessa, johon lisätään puskuri. Näytteitä ladataan geelille niiden DNA-pitoisuuden mukaisesti. (12, s. 3.) Ajoon käytetty jännite ja aika vaikuttavat näytteiden kulkeutumiseen ja erottumiseen geelissä. DGGE-geelin värjäämiseen käytetään yleensä kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvia fluoresoivia väriaineita (esimerkiksi SYBR Gold), hopeavärjäystä tai etidiumbromidia. [11.]



*Kuva 1. DGGE-geelin valmistuksessa käytettävä gradienttipyörä, jossa kaksi ruiskua geelin denaturoivia liuoksia varten. Geeli valetaan pyörittämällä pyörää, jolloin ruiskut tyhjenevät eri tahtiin muodostaen gradientin. [12, s. 5.]*

### 3.2 Muita sormenjälkianalyysijä

Pulssikenttägeelelektroforeesi eli PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) on tekniikka, joka erottelee DNA-molekyylit agarosigeelillä kahden eri sähkökentän avulla. PFGE:n erottelemat DNA-molekyylit voivat olla kooltaan 10 kb – 10 Mb, mikä mahdollistaa kokonaisten kromosomien tai niiden fragmenttien tarkastelun. Tekniikan avulla voidaan esimerkiksi paikallistaa kloonattuja sekvenssejä kromosomeista ja muodostaa genomisia kartoja. [13, s. 557, 563.]

T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) on menetelmä, jonka avulla voidaan profiloida mikrobiyhteisöjä entsymaattisesti. Menetelmässä haluttu merkkigeeni monistetaan ensin PCR-reaktiolla käyttäen fluoresenssileimattua aluketta. PCR-tuotteet pilkotaan restriktioentsyymeillä ja syntyneet fragmentit erotellaan geielektroforeesilla. Lisäksi leimatut fragmentit tunnistetaan detektorilla. Tuloksena on kuvaaja, jossa x-akseli kuvaa fragmentin kokoa ja y-akseli fluoresenssin intensiteettiä. Näytteiden profiileja voidaan vertailla sen perusteella, syntyykö fragmenttia vai ei, ja kuinka voimakas se on. [14, s. 20–21.]

## 4 AINEISTOT JA MENETELMÄT

### 4.1 Näytteet

Tässä työssä näytteinä oli neljä eri tavalla käsiteltyä metsämaan humusnäytettä, jotka oli kerätty Helsingin yliopiston Ympäristötieteiden laitoksen lannoituskokeesta Lammin Evolta. Kokeessa metsää oli lannoitettu typellä (salpietari) ja tuhkalla erikseen ja yhdessä. Kontrollinäytteenä toimi lannoittamaton humusmaa. Lannoituskoe oli toteutettu jo kymmenen vuotta sitten ja maanäytteet otettu neljä vuotta sitten. Maanäytteistä oli eristetty DNA FastDNA SPIN for Soil Kit –reagenssisarjan (MP Biomedicals) avulla ja eristetty DNA oli säilytetty -75 °C pakastimessa. [15, s. 12.]

## 4.2 PCR-monistusreaktiot

### 4.2.1 Sienten ITS-alueiden monistus humusnäytteistä

Sienten tunnistukseen neljästä eri humusmaanäytteestä käytettiin ITS alueita (internal transcribed spacer), jotka ovat sienen ribosomaalista DNA:ta koodaavien geenien (18S rDNA) välisiä alueita (16). ITS-alueet monistettiin ennen DGGE-analyysia universaalien ITS1 f GC- (00408F3F03 Oligomer Oy, Helsinki) ja ITS2 r- (00408H2B12 Oligomer Oy, Helsinki) alukkeiden avulla (taulukko 1). Positiivisena kontrollina käytettiin kompostista eristetyn hiivan genomista DNA:ta ("Tuntematon 5"). Tuntematon 5:n sekvenssi vastaa *Candida ethanolica* -lajia 96 %:n todennäköisyydellä. Negatiivisena kontrollina käytettiin steriiliä vettä.

*Taulukko 1. Tässä työssä PCR-reaktioissa käytettyjen alukkeiden kohdegeenit ja sekvenssit*

Nimi	Kohdegeeni	Sekvenssi	Lähde
ITS1F	ITS 1-2	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	18
ITS2R	ITS 1-2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	18
ITS1F-GC	ITS 1-2	5'-CGC CCG CCGCGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA-3'	19
MF341	16S rDNA	5'-CTACGGGAGGCAGCA-3'	20
MR907	16S rDNA	5'-CCGTCAATTCMTTGAGTTT-3'	20
MF341-GC	16S rDNA	5'-CGCCCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TACGGG AGG CAG CAG-3'	21
β-AMOf	16S rDNA	5'-TGG GGR ATA ACG CAY CGA AAG-3'	22
β-AMOr	16S rDNA	5'-AGA ACT CCG ATC CGG ACT ACG-3'	22
CTO189f A/B-GC	16S rDNA	5'-CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GGA GRA AAG CAG GGG ATC G-3'	22
CTO189f C-GC	16S rDNA	5'-CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GGA GGA AAG TAG GGG ATC G-3'	22
CTO654r	16S rDNA	5'-CTA GCY TTG TAG TTT CAA ACG C-3'	22

ITS-alueiden monistukseen käytetty PCR-reaktioseos sisälsi templaatti-DNA:ta 1 µl sekä muita reagensseja lopputilavuuden ollessa 50 µl (taulukko 2).



Taulukko 2. Humusnäytteiden ITS-alueen PCR-monistuksen reaktioseos

Reagenssi	Pitoisuus
dNTP Mix (F-560L, Finnzymes Oy, Espoo)	0,2 mM
Dynazyme™ II polymeraasi (F-501L, Finnzymes Oy, Espoo)	2 U
Dynazyme-puskuri (F-511, Finnzymes Oy, Espoo)	1X
ITS1 f GC -aluke	0,2 µM
ITS2 r -aluke	0,2 µM
Naudan seerumialbumiini (Bovine serum albumin, #B14, Fermentas)	0,4 mg/ml
Steriili vesi	
Templaatti-DNA (1:10 ja 1:50)	

DNA monistettiin Doppio Thermal Cycler PCR-laitteella (VWR) (taulukko 3). PCR-tuotteiden koko tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla Minicell® Primo™ Electrophoretic Gel System (Thermo Electron Corporation EC340) laitteiston avulla käyttäen 1 % agarosigeeliä ja 1X TAE puskuria (40 mM Tris, 20mM etikkahappo, 1mM EDTA). Kokomarkkerina oli GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, jota ladattiin geelille 1 µl.

Taulukko 3. Humusnäytteiden ITS-alueen PCR-monistuksen ohjelma

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. alkudenaturaatio	95	8 min
2. denaturaatio	95	1 min
3. sitoutuminen	58	1 min
4. pidentyminen	72	1 min
5. vaiheet 2 - 4 toistetaan vielä 35 kertaa		
6. loppupidentyminen	72	10 min

#### 4.2.2 Bakteerien 16S rDNA -merkkigeenin monistus humusnäytteistä

Bakteerien tunnistukseen humusmaanäytteistä käytettiin alukkeita MF341 GC (00408F3E03 Oligomer Oy, Helsinki) ja MR907 (00408H2C12 Oligomer Oy, Helsinki), joiden avulla voidaan monistaa bakteereille ominaista 16S rRNA -geeniä koodaavaa DNA-jaksoa (taulukko 1). Bakteerialukkeet sisälsivät GC-hännän PCR-tuotteiden erottumista varten DGGE-analyysissä. Positiivisena kontrollina käytettiin *Pseudomonas aeruginosa* genomista DNA:ta (ATCC 15442D-5) ja negatiivisena kontrollina steriiliä vettä.

PCR-monistusreaktio oli vastaava kuin sienten ITS-aluetta monistettaessa ohjelman ollessa kuitenkin hieman erilainen (taulukko 4). Näytteet olivat laimentamattomia tai laimennettu 1:10; positiivisen kontrollin laimennos oli 1:10. PCR-tuotteiden koko tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla vastaavasti kuin sienillä.

*Taulukko 4. Humusnäytteiden bakteerien 16S rDNA -merkkigeenin PCR-monistuksen ohjelma*

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. alkudenaturaatio	94	5 min
2. denaturaatio	94	20 s
3. sitoutuminen	57	20 s
4. pidentyminen	72	30 s
5. vaiheet 2 - 4 toistetaan vielä 32 kertaa		
6. loppupidentyminen	72	5 min

#### 4.2.3 AOB:n 16S rDNA -merkkigeenin monistus humusnäytteistä

AOB:n tunnistamiseen humusmaanäytteistä käytettiin nested PCR -menetelmää, jolla monistettiin bakteerien 16S rRNA:ta koodaavaa geeniä. Ensimmäiseen PCR-reaktioon käytettiin  $\beta$ AMOf (00504H2A03 Oligomer Oy, Helsinki) ja  $\beta$ AMOr (00504H2B03 Oligomer Oy, Helsinki) alukkeita, jotka ovat selektiivisiä  $\beta$ -proteobakteereille (taulukko 1). Toiseen PCR-reaktioon käytettiin CTO189f A/B+C-GC (00504F3F03 ja 00504F3G03 Oligomer Oy, Helsinki) ja CTO654r (00504H2C03 Oligomer Oy, Helsinki) alukkeita (taulukko 1), jotka ovat spesifisiä kaikille tunnetuille ammoniakkia hapettaville  $\beta$ -proteobakteereille muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta (17). Positiivisena kontrollina käytettiin *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718D) genomista DNA:ta ja negatiivisena kontrollina steriiliä vettä.

Ensimmäinen PCR-reaktio oli vastaava kuin sienillä ja bakteereilla, ilman BSA:n lisäystä. Monistusohjelma oli myös hieman erilainen (taulukko 5).

*Taulukko 5. Humusnäytteiden AOB:n 16S rDNA -merkkigeenin 1. kierroksen PCR-monistuksen ohjelma*

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. alkudenaturaatio	94	5 min
2. denaturaatio	94	40 s
3. sitoutuminen	55	40 s
4. pidentyminen	72	2 min
5. vaiheet 2 - 4 toistetaan vielä 29 kertaa		
6. loppupidentyminen	72	10 min

Toinen PCR-reaktio toteutettiin samoin kuin ensimmäinen lukuun ottamatta templaattia, jona käytettiin ensimmäisen PCR-reaktion tuotteita 1 µl. Lisäksi reaktioseos sisälsi 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ja monistusohjelma oli hieman erilainen (taulukko 6).

*Taulukko 6. Humusnäytteiden AOB:n 16S rDNA -merkkigeenin 2. kierroksen PCR-monistuksen ohjelma*

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. alkudenaturaatio	94	5 min
2. denaturaatio	94	30 s
3. sitoutuminen	57	30 s
4. pidentyminen	72	45 s
5. vaiheet 2-4 toistetaan vielä 34 kertaa		
6. loppupidentyminen	72	10 min

Toisen kierroksen PCR-tuotteissa näkyi agarosigeelillä ylimääräinen juova epäpuhtautena, minkä takia haluttu tuote päätettiin puhdistaa agarosigeelistä, monistaa se ja toteuttaa DGGE-analyysi. 1 % agarosigeelille ladattiin 5 µl nested-PCR:n toisen kierroksen PCR-tuotteita ja haluttu juova leikattiin geelistä irti. PCR-tuote puhdistettiin geelistä QIAquick Gel Extraction kitin (Qiagen) avulla ja DNA:ta monistettiin PCR-reaktiolla, joka vastasi sisällöltään ja ohjelmaltaan nested-PCR:n toista kierrosta. Tuotteissa oli edelleen ylimääräisiä bändejä, joten reaktioseoksesta jätettiin  $MgCl_2$  pois ja ohjelmaa kiristettiin nostamalla sitoutumislämpötila 58 °C:een ja vähentämällä syklien määrä 30 kierrokseen. Lopuksi PCR-monistuksen tulokset tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla.

### 4.3 DGGE-analyysit ja PCR-monistusreaktiot DGGE:n jälkeen

#### 4.3.1 Sienten DGGE-analyysi ja DNA:n monistus

DGGE-analyysi tehtiin PCR-reaktiolla monistetuille sieninäytteille kaksi kertaa käyttäen DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio Rad) -laitteistoa. DGGE-analyysissä käytettiin 8 % (w/v)polyakryyliamidigeeliä ja denaturoivaa gradienttia 18–58 % (100 % sisältää 7 M ureaa ja 40 % formamidia). Ensimmäisessä analyysissä käytettiin näytelaimennoksia 1:10 ja toisessa 1:50 ja 1:10, positiivisen kontrollin laimennos oli 1:10. Näytteitä pipetoitiin geeliin 20–30 µl ja positiivista kontrollia 15 µl. Latauspuskuria käytettiin 3 µl. Geeli ajettiin 1X TAE-puskurissa (40 mM Tris, 20mM etikkahappo, 1mM EDTA) ajoparametrien ollessa 60 °C, 200 V, 30 minuuttia ja 60 °C, 80 V, 17 tuntia. Geeliä värjättiin Sybr Gold -värillä (Sybr Gold Nucleic Acid Gel Stain, S11494 Invitrogen, laimennos 1:10 000) 45 minuuttia. Värjätty geeli kuvattiin Multimage™ Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation) -kuvauslaitteistolla ja ChemImager 5500 -ohjelmalla. Geelin juovat leikattiin talteen 25 µl:aan steriiliä vettä Hoefer Macrover UV-20 -valopöydällä. Juovia vorteksoitiin 15 minuuttia, sentrifugoitiin 15 minuuttia ja säilytettiin yön yli jääkaapissa.

Yön yli säilytettyjä geelijuovia sentrifugoitiin 2x15 minuuttia ja käytettiin liuennut DNA suoraan templaattina PCR-monistusreaktioon. Alukkeina käytettiin ITS 1 f (00408H2D12 Oligomer Oy, Helsinki) ja ITS2 r -alukkeita (ilman GC-häntää) sekä muita reagensseja lopputilavuuden ollessa 50 µl (taulukko 7).

*Taulukko 7. Humusnäytteiden ITS-alueen DGGE-analyysin jälkeisen PCR-monistuksen reaktioseos*

Reagenssi	Pitoisuus
dNTP Mix (F-560L, Finnzymes Oy, Espoo)	0,2 mM
Dynazyme™ II polymeraasi (F-501L, Finnzymes Oy, Espoo)	2 U
Dynazyme-puskuri (F-511, Finnzymes Oy, Espoo)	1X
ITS1 f -aluke	0,2 µM
ITS2 r -aluke	0,2 µM
Naudan seerumialbumiini (Bovine serum albumin, #B14, Fermentas)	0,4 mg/ml
Steriili vesi	
Templaatti-DNA	

DNA monistettiin Doppio Thermal Cycler PCR-laitteen avulla (VWR) (taulukko 8). PCR-tuotteiden koko ja puhtaus tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla.

*Taulukko 8. Humusnäytteiden ITS-alueen DGGE-analyysin jälkeisen PCR-monistuksen ohjelma*

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. alkudenaturaatio	95	8 min
2. denaturaatio	95	1 min
3. sitoutuminen	55	1 min
4. pidentyminen	72	1 min
5. vaiheet 2 - 4 toistetaan vielä 35 kertaa		
6. loppupidentyminen	72	10 min

#### *4.3.2 Bakteerien DGGE-analyysi ja DNA:n monistus*

DGGE-analyysi tehtiin PCR-reaktiolla monistetuille bakteerinäytteille kolme kertaa vastaavasti kuin sienille, paitsi että DGGE-geelin gradientti oli 30–60 %. Ensimmäisessä analyysissä käytettiin näytelaimennoksia 1:10, toisessa laimentamattomia ja 1:10 laimennoksia ja kolmannessa laimentamattomia näytteitä. Näytteitä pipetoitiin geeliin 20–25 µl ja positiivista kontrollia 15 µl. Latauspuskuria käytettiin 3 µl. Myös geelin värjäys, kuvaus ja juovien käsittely toteutettiin kuten sienillä.

Juovista liuennut DNA käytettiin suoraan templaattina PCR-monistusreaktioon. Alukkeina käytettiin MF341 (00408H2A12 Oligomer Oy, Helsinki) ja MR907 -alukkeita, ilman GC-häntää. PCR-reaktio oli vastaava kuin sienillä templaatin määrän ollessa 0,5 - 3 µl sekä ohjelman ollessa hieman erilainen (taulukko 9). PCR-tuotteiden koko ja puhtaus tarkistettiin agaroosigeelielektroforeesilla.

*Taulukko 9. Humusnäytteiden bakteerien 16S rDNA -merkkigeenin DGGE-analyysin jälkeisen PCR-monistusreaktion ohjelma*

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. alkudenaturaatio	94	5 min
2. denaturaatio	94	20 s
3. sitoutuminen	57 - 58	20 s
4. pidentyminen	72	30 s
5. vaiheet 2 - 4 toistetaan vielä 24 - 32 kertaa		
6. loppupidentyminen	72	5 min

#### 4.3.3 AOB:n DGGE-analyysi ja DNA:n monistus

PCR -reaktiolla monistetuille AOB-tuotteille toteutettiin DGGE-analyysi vastaavasti kuin sienille ja bakteereille, geeligradientin ollessa kuitenkin 35 - 57 % ja ajoparametrien 60 °C, 200 V, 4,5 tuntia. Näytteitä pipetoitiin geelille 20 - 25 µl ja positiivista kontrollia 15 - 25 µl. Latauspuskuria käytettiin 3 µl. Geelin värjäys, kuvaus ja juovien käsittely toteutettiin kuten sienillä ja bakteereilla.

Juovista liuennut DNA käytettiin suoraan templaattina PCR-monistusreaktioon. Alukkeina käytettiin CTO189f A/B+C ja CTO654r -alukkeita, ilman GC-häntää. PCR-reaktio oli vastaava kuin sienillä ja bakteereilla, ilman BSA:n lisäystä ja templaatin määrän ollessa 1 - 2 µl sekä ohjelman ollessa hieman erilainen (taulukko 10). PCR-tuotteiden koko ja puhtaus tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla.



*Taulukko 10. Humusnäytteiden AOB:n 16S rDNA -merkkigeenin DGGE-analyysin jälkeisen PCR-monistusreaktion ohjelma*

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. alkudenaturaatio	94	5 min
2. denaturaatio	94	30 s
3. sitoutuminen	55 - 58	30 s
4. pidentyminen	72	45 s
5. vaiheet 2 - 4 toistetaan vielä 29 - 34 kertaa		
6. loppupidentyminen	72	10 min

#### 4.4 Sekvensointi, sekvenssien tulkinta ja sormenjälkianalyysit

Sieni-, bakteeri- ja AOB-näytteiden DGGE-analyysin jälkeiset PCR-tuotteet sekvensoitiin Biotekniikan instituutissa Helsingissä. Saadut sekvenssit linjattiin EMBL-EBI:n (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute) ClustalW2 työkalun avulla (saatavissa osoitteesta <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) ja tarkasteltiin niiden samankaltaisuutta fylogeneettisessä puukuviossa. Puukuviossa lähekkäin sijaitsevat sekvenssit rinnastettiin EMBL EBI:n EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms

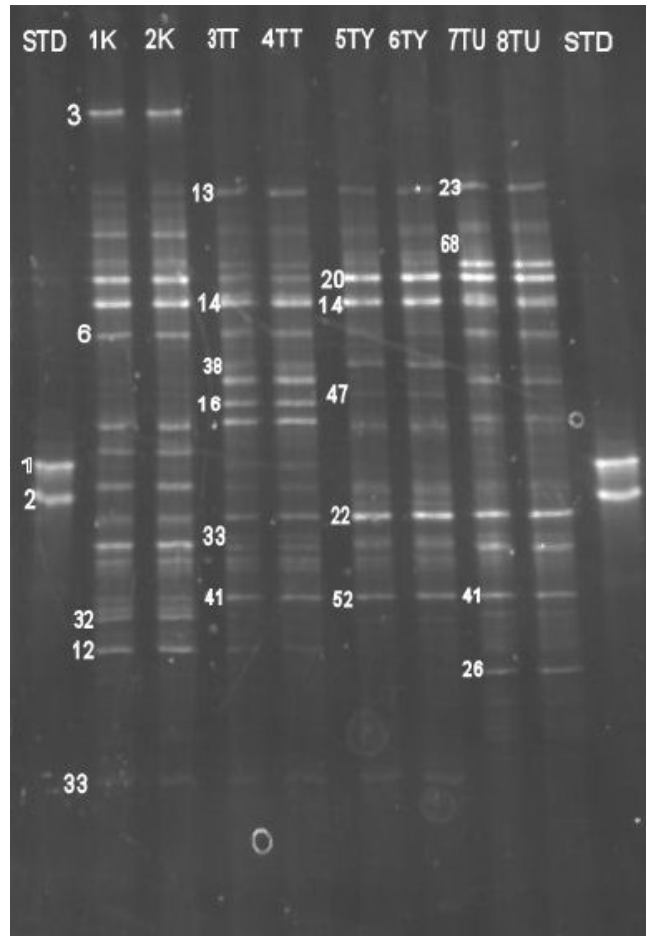
-työkalun avulla (saatavissa osoitteesta <http://www.ebi.ac.uk/>). Rinnastuksessa käytettiin EMBOSS "water" asetusta, joka etsii kahden sekvenssin yhtäläisyydet välittämättä sekvenssin pituudesta. Yhteneväsyyden ollessa 98 % tai enemmän, sekvenssit tulkittiin samoiksi. Erilaisille sekvensseille haettiin todennäköinen nimi NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) Blast-työkalun avulla (saatavissa osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Lisäksi erilaisista sekvensseistä tehtiin uusi puukuvio EMBL-EBI:n ClustalW-työkalun avulla.

DGGE-analyysien geelikuvien juovista piirrettiin matriisi ChemImager 5500 -ohjelman avulla. Matriisiin merkittiin plus-merkki (+) kuvaamaan geelikuvan juovaa ja miinus-merkki (-) tyhjää kohtaa. Matriisien avulla piirrettiin juovista sormenjälkikuvio FAMD- ja TreeView -ohjelmilla. FAMD (Fingerprint Analysis with Missing Data) on vapaasti Internetistä ladattava ohjelma (saatavissa osoitteesta <http://www.famd.me.uk/famd.html>), joka on alun perin kehitetty eri sormenjälkianalyysien tulosten tulkintaan, erityisesti monitulkintaisen tai puuttuvan tiedon parempaan analysointiin. Ohjelman avulla voi tuloksia tarkastella puukuviona tai laskea tulosten välisiä samankaltaisuuksia ja etäisyyksiä. [23.] TreeView-ohjelmaa käytettiin visualisoimaan saatu puukuvio.

## 5 TULOKSET

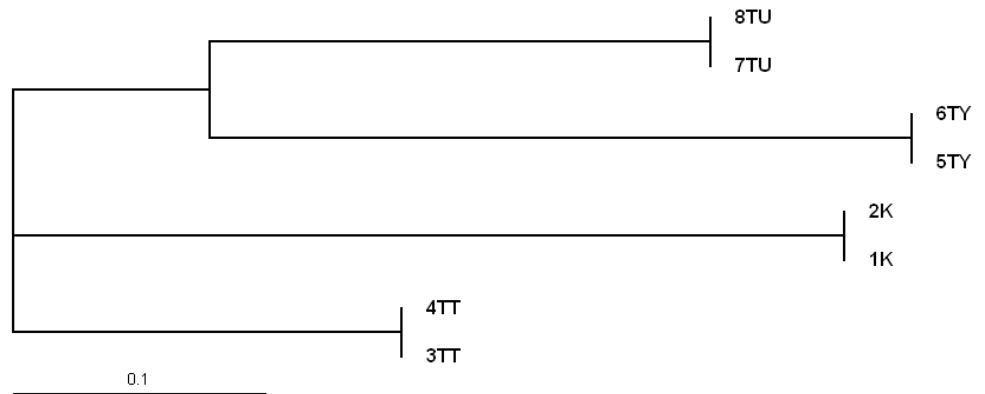
### 5.1 Sienten ITS-alueen monistus, DGGE-analyysi ja sekvensointi

Metsämaan humusnäytteistä monistettiin PCR-reaktiolla sienille ominaista 18S rDNA -merkkigeenin ITS-aluetta, joka erotettiin DGGE-analyysillä (kuva 2). Samankokoiset, mutta erilaisen emäskoostumuksen omaavat PCR-tuotteet saatiin eroteltua toisistaan DGGE-geelillä.



Kuva 2. Metsämaan humusnäytteistä monistetun ITS-alueen DGGE-analyysin geelikuva. Standardi on Tunteaton 5, 1K ja 2K ovat kontrollinäyte (lannoittamaton humusmaa), 3TT ja 4TT ovat typpi- ja tuhkakäsitelty humusmaa, 5TY ja 6TY ovat typpikäsitelty humusmaa sekä 7TU ja 8TU ovat tuhkakäsitelty humusmaa. Numerolla merkityistä juovista saatiin onnistunut sekvenssi (taulukko 2).

Sienten DGGE-analyysin geelikuvan juovista piirrettiin ChemImager 5500 -ohjelman avulla matriisi. Matriisi muutettiin sormenjälkikuvioksi FAMD- ja TreeView -ohjelmilla (kuva 3). Sormenjälkikuvio kuvaa DGGE-analyysin juovien välisiä sekä eri lannoituskäsittelyiden välisiä eroja.



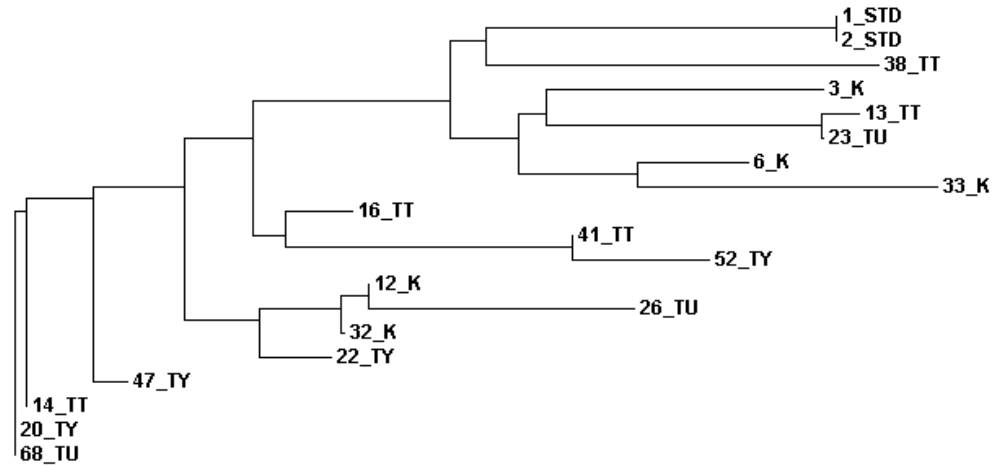
*Kuva 3. Metsämaan humusnäytteistä monistetun ITS-alueen DGGE-analyysin geelikuvan perusteella piirretty sormenjälkikuvio. 1K ja 2K ovat kontrollinäyte (lannoittamaton humusmaa), 3TT ja 4TT ovat typpi- ja tuhkakäsitelty humusmaa, 5TY ja 6TY ovat typpikäsitelty humusmaa sekä 7TU ja 8TU ovat tuhkakäsitelty humusmaa.*

Sienten DGGE-analyysin jälkeen juovat leikattiin talteen ja monistettiin PCR-reaktiolla. PCR-tuotteita lähetettiin sekvensoitavaksi 76 kappaletta, joista 32 sekvenssiä oli onnistuneita. Onnistuneen sekvenssin pituus oli yli 160 emäsparia, eikä siinä ollut päällekkäisyyksiä. Näistä sekvensseistä 18 todettiin erilaisiksi, uniikeiksi sekvensseiksi ja ne tunnistettiin NCBI:n Blast-työkalun avulla (taulukko 11).

*Taulukko 11. Metsämaan humusnäytteistä monistetun ITS-alueen DGGE-analyysin tunnistetut juovat (kuva 2), juovan käsittely, sekvenssin nimi, tunnistenumero NCBI:n tietokannassa, samankaltaisuus tietokannan kanssa, sekvenssin pituus sekä muut huomiot.*

Juovanro	Käsittely	Nimi	Tietokanta-numero	Samankaltaisuus (%)	Pituus (bp)	Huom.
1	std	Uncultured compost fungus	FM177655.1	99	160	
2	std	Uncultured compost fungus	FM177655.1	98	163	
3	kontr.	Candida ralunensis strain AS 2.1942	AY821842.1	98	254	
12	kontr.	Uncultured ectomycorrhiza (Russula) isolate UBCOGR560	EU597058.1	96	271	
13	typpi+tuhka	Uncultured fungus clone C4 3B	GU366707.1	95	243	
14	typpi+tuhka	Uncultured ectomycorrhizal fungus	AJ633120.1	100	249	Käsittelyssä typpi sama sekvenssi
16	typpi+tuhka	Lepiota magnispora	AF391023.1	98	275	
20	typpi	Uncultured Tylospora clone 5600-912	HM146888.1	99	261	
22	typpi	Russula sp. H22	AJ534905.1	98	265	
23	tuhka	Uncultured soil fungus clone 4_L_G10	EU806418.1	99	231	
26	tuhka	Uncultured Russulaceae isolate RDA2	DQ061926.1	97	178	
32	kontr.	Uncultured ectomycorrhiza (Russula)	FM992959.1	97	211	
33	kontr.	Penicillium citreonigrum	AY157489.1	95	233	Käsittelyssä typpi+tuhka sama sekvenssi
38	typpi+tuhka	Neonectria radicola strain 841	GU934581.1	97	196	
41	typpi+tuhka	Tomentella sp. D14	AJ534913.1	98	176	Käsittelyssä tuhka sama sekvenssi
47	typpi	Amphinema byssoides	GQ162810.1	100	226	
52	typpi	Tomentella sp. D14	AJ534913.1	96	175	
68	tuhka	Tylospora asterophora clone NS223	DQ068973.1	100	249	

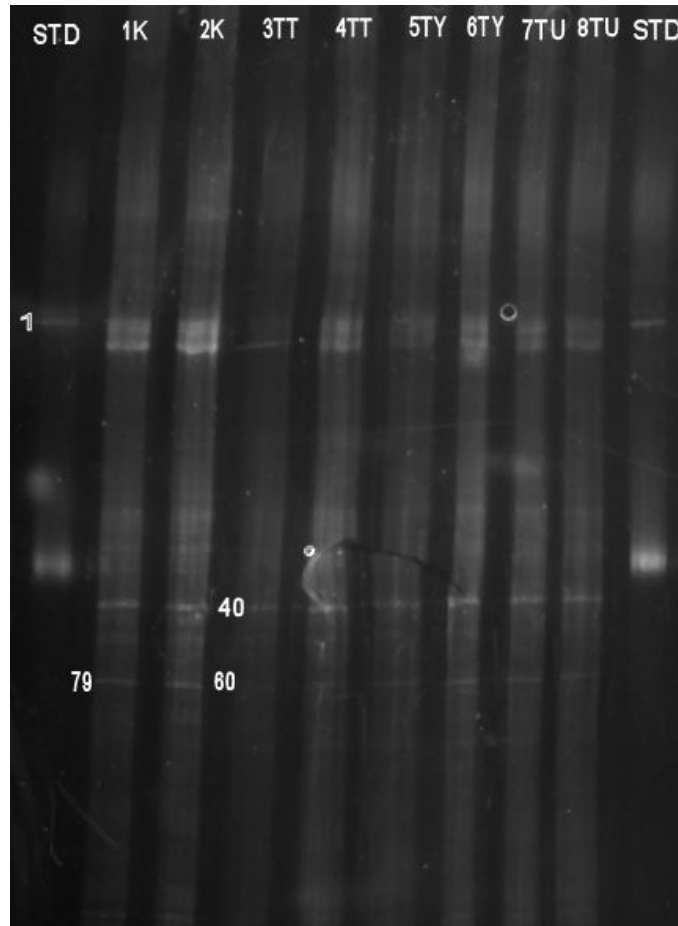
Sienten erilaisista sekvensseistä tehtiin fylogeneettinen puukuvio ClustalW-ohjelmalla, joka kuvaa sekvenssien välisiä eroja (kuva 4).



Kuva 4. Metsämaan humusnäytteistä monistetun ITS-alueen onnistuneiden sekvenssien fylogeneettinen puu, jossa STD on Tuntematon 5, K on kontrollinäyte (lannoittamaton humusmaa), TT on typpi- ja tuhkakäsitelty humusmaa, TY on typpikäsitelty humusmaa sekä TU on tuhkakäsitelty humusmaa. Numero vastaa taulukon 11 juovan numeroa.

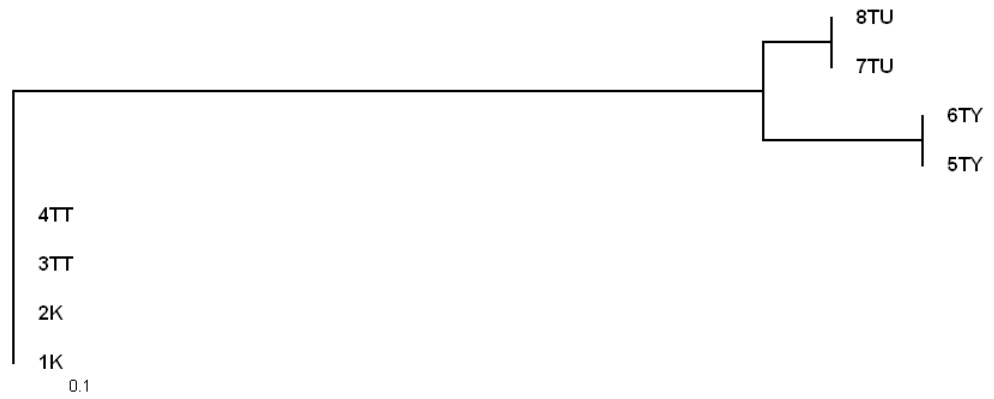
## 5.2 Bakteerien 16S rDNA -merkkigeenin monistus, DGGE-analyysi ja sekvensointi

Metsämaan humusnäytteistä monistettiin bakteerien tunnistamiseksi 16S rDNA -merkkigeeniä, joka erotettiin DGGE-analyysillä (kuva 5).



Kuva 5. Metsämaan humusnäytteistä monistetun 16S rDNA -merkkigeenin (bakteerit) DGGE-analyysin geelikuva. Standardi on *Pseudomonas aeruginosa* genomisen DNA, 1K ja 2K ovat kontrollinäyte (lannoittamaton humusmaa), 3TT ja 4TT ovat typpi- ja tuhkakäsitelty humusmaa, 5TY ja 6TY ovat typpikäsitelty humusmaa sekä 7TU ja 8TU ovat tuhkakäsitelty humusmaa. Numerolla merkityistä juovista saatiin onnistunut sekvenssi (taulukko 3).

Bakteerien DGGE-analyysin geelikuvan juovista piirrettiin ChemImager 5500 -ohjelman avulla matriisi, joka muutettiin FAMD- ja TreeView -ohjelmilla sormenjälkikuvioksi (kuva 6). Sormenjälkikuvio kuvaa DGGE-analyysin juovien välisiä sekä eri lannoituskäsittelyiden välisiä eroja.



Kuva 6. Metsämaan humusnäytteistä monistetun 16S rDNA -merkkigeenin (bakteerit) DGGE-analyysin geelikuvan perusteella piirretty sormenjälkikuvio. 1K ja 2K ovat kontrollinäyte (lannoittamaton humusmaa), 3TT ja 4TT ovat typpi- ja tuhkakäsitelty humusmaa, 5TY ja 6TY ovat typpikäsitelty humusmaa sekä 7TU ja 8TU ovat tuhkakäsitelty humusmaa.

Bakteerien DGGE-analyysin jälkeen juovat leikattiin talteen ja monistettiin PCR-reaktiolla. PCR-tuotteita lähetettiin sekvensoitavaksi 81 kappaletta, joista 11 oli onnistunutta sekvenssiä. Onnistuneen sekvenssin pituus oli yli 470 emäsparia, eikä siinä ollut päällekkäisyyttä. Näistä sekvensseistä neljä todettiin erilaisiksi sekvensseiksi ja ne tunnistettiin NCBI:n Blast-työkalun avulla (taulukko 12).

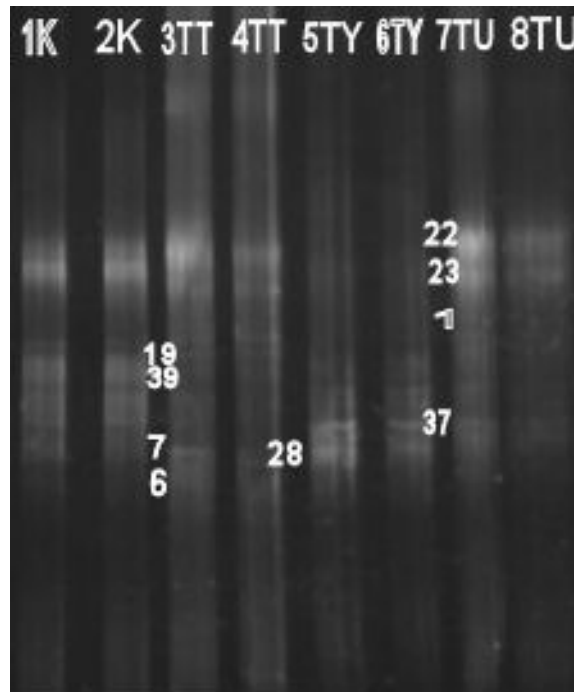
Taulukko 12. Metsämaan humusnäytteistä monistetun 16S rDNA merkkigeenin (bakteerit) DGGE-analyysin tunnistetut juovat, juovan käsittely, sekvenssin nimi, tunnistenumero NCBI:n tietokannassa, samankaltaisuus tietokannan kanssa sekä sekvenssin pituus.

Juovan nro	Käsittely	Nimi	Tietokanta-numero	Samankaltaisuus (%)	Pituus (bp)
1	std	Pseudomonas aeruginosa strain LJQ-1	HM752579.1	100	519
40	typpi+tuhka	Uncultured bacterium clone I1N-D14-C_B4	HM125346.1	99	493
60	typpi+tuhka	Uncultured Acidobacteria bacterium clone Amb_16S_822	EF018559.1	98	473
79	kontrolli	Uncultured soil bacterium clone 21_77KB11	GQ918954.1	98	495



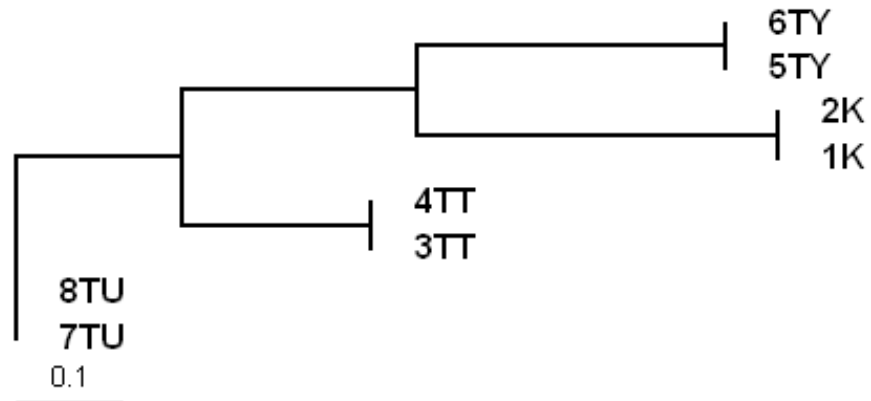
### 5.3 AOB:n 16S rDNA -merkkigeenin monistus, DGGE-analyysi ja sekvensointi

Metsämaan humusnäytteistä monistettiin ammoniakkia hapettavien bakteerien tunnistamiseksi 16S rDNA -merkkigeeniä  $\beta$ -proteobakteereille selektiivisillä alukkeilla. PCR-tuotteet erotettiin DGGE-analyysillä (kuva 7).



Kuva 7. Metsämaan humusnäytteistä monistetun 16S rDNA -merkkigeenin (AOB) DGGE-analyysin geelikuva. 1K ja 2K ovat kontrollinäyte (lannoittamaton humusmaa), 3TT ja 4TT ovat typpi- ja tuhkakäsitelty humusmaa, 5TY ja 6TY ovat typpikäsitelty humusmaa sekä 7TU ja 8TU ovat tuhkakäsitelty humusmaa. Numerolla merkityistä juovista saatiin onnistunut sekvenssi (taulukko 4).

AOB:n DGGE-analyysin geelikuvan juovista piirrettiin ChemImager 5500 -ohjelman avulla matriisi, joka muutettiin FAMD- ja TreeView -ohjelmilla sormenjälkikuvioksi (kuva 8). Sormenjälkikuviokuva DGGE-analyysin juovien välisiä sekä eri lannoituskäsittelyiden välisiä eroja.



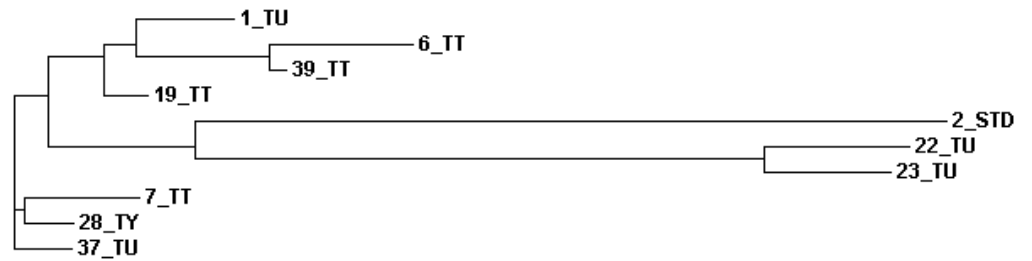
Kuva 8. Metsämaan humusnäytteistä monistetun 16S rDNA -merkkigeenin (AOB) DGGE-analyysin geelikuvan perusteella piirretty sormenjälkikuvio. 1K ja 2K ovat kontrollinäyte (lannoittamaton humusmaa), 3TT ja 4TT ovat typpi- ja tuhkakäsitelty humusmaa, 5TY ja 6TY ovat typpikäsitelty humusmaa sekä 7TU ja 8TU ovat tuhkakäsitelty humusmaa.

AOB:n DGGE-analyysin jälkeen juovat leikattiin talteen ja monistettiin PCR-reaktiolla. PCR-tuotteita lähetettiin sekvensoitavaksi 58 kappaletta, joista 23 oli onnistunutta sekvenssiä. Onnistuneen sekvenssin pituus oli yli 340 emäsparia eikä siinä ollut päällekkäisyyksiä. Näistä sekvensseistä 10 todettiin erilaisiksi sekvensseiksi ja ne tunnistettiin NCBI:n Blast-työkalun avulla (taulukko 13).

*Taulukko 13. Metsämaan humusnäytteistä monistetun 16S rDNA -merkkigeenin (AOB) DGGE-analyysin tunnistetut juovat (kuva 7), juovan käsittely, sekvenssin nimi, tunnistenumero NCBI:n tietokannassa, samankaltaisuus tietokannan kanssa sekä sekvenssin pituus.*

Juovan nro	Käsittely	Nimi	Tietokanta-numero	Samankaltaisuus (%)	Pituus (bp)
1	tuhka	Uncultured beta proteobacterium 16S rRNA gene, clone L6	AM230794.1	98	418
2	std	Nitrosomonas europaea strain ATCC 25978	GQ451713.1	100	409
6	typpi+ tuhka	Uncultured Nitrospira sp. clone 469A1	EU127382.1	98	346
7	typpi+ tuhka	Nitrospira sp. Nsp2	AY123802.1	99	416
19	typpi+ tuhka	Uncultured beta proteobacterium clone M39C6-E01	EU070299.1	99	415
22	tuhka	Uncultured beta proteobacterium clone M22C6-F05	EU070270.1	99	419
23	tuhka	Uncultured beta proteobacterium clone M22C21-D07	EU070256.1	97	415
28	typpi	Uncultured beta proteobacterium clone M58C6-F05	EU070228.1	99	415
37	tuhka	Uncultured beta proteobacterium clone M34C18-H02	EU069938.1	99	419
39	typpi+ tuhka	Uncultured beta proteobacterium clone M39C6-E01	EU070299.1	98	422

AOB:n erilaisista sekvensseistä tehtiin fylogeneettinen puukuvio ClustalW-ohjelmalla, joka kuvaa sekvenssien välisiä eroja (kuva 9).



Kuva 9. Metsämaan humusnäytteistä monistetun 16S rDNA -merkkigeenin (AOB) onnistuneiden sekvenssien fylogeneettinen puu, jossa STD on *Nitrosomonas europaea* genomisen DNA, TT on typpi- ja tuhkakäsitelty humusmaa, TY on typpikäsitelty humusmaa sekä TU on tuhkakäsitelty humusmaa. Numero vastaa taulukon 13 juovan numeroa.

## 6 TULOSTEN TULKINTA

### 6.1 Sienet

Humusnäytteistä monistetun 18S rDNA -merkkigeenin ITS-alueen erotus DGGE-menetelmällä onnistui hyvin. Noin puolet DGGE-geelin juovista onnistuttiin sekvensoimaan. Sekvenssien tunnistamisessa samankaltaisuus tietokannan tarjoamaan vaihtoehtoon oli kaikissa tapauksissa hyvä.

DGGE-analyysissä havaittiin eroja humusmaan lannoituskäsittelyiden välillä sienilajiston kesken, mikä näkyy DGGE-geelin juovien avulla piirrettyssä sormenjälkikuviossa (kuva 3). Kuviossa rinnakkaiset näytteet sijoituivat samaan kohtaan, mutta eri käsittelyt eri kohtiin. Käsittelyt eivät siis olleet tuottaneet samanlaisia kuvioita DGGE-analyysissä.

Humusnäytteistä monistetun ITS-alueen DGGE-analyysin geelikuvassa saman matkan eri lannoituskäsittelyissä olivat kulkeutuneet juovat 13 ja 23 sekä 41 ja 52. Juovat 13 ja 23 ovat molemmat luokittelemattomia sieniklooneja (Uncultured fungus clone C4 3B ja Uncultured soil fungus clone 4\_L\_G10) ja löytyivät typpi-tuhka- sekä tuhkakäsittelyistä näytteistä. Juovien 41 ja 52 sekvenssi on todennäköisesti *Tomentella sp.* (D14), joka on ektomykorritsasieni. Juovat löytyivät typpi-tuhka- ja typpikäsittelyistä näytteistä.

Lannoitus voi vähentää tai lisätä sienilajien määrää humusmaassa. Juova 3 eli laji *Candida ralunensis* (strain AS 2.1942) esiintyi vain kontrollinäytteessä. Laji oli siis hävinnyt typpi- ja tuhkakäsittelyjen myötä. Juova 38 eli *Neonectria radicola* (strain 841) esiintyi sen sijaan sekä typpi-tuhkakäsittelyssä että typpinäytteessä, mutta ei kontrollinäytteessä. *Neonectria radicola* on kasvipatogeeni, jota on löydetty mm. viinirypäleistä, vadelmasta ja metsäpuustosta [24].

Juova 16 eli *Lepiota magnispora* sekä juova 47 eli *Amphinema byssoides* esiintyivät vain typpikäsittelyssä näytteessä. *Lepiota magnispora* on suomeksi vanu-ukonsieni. *Amphinema byssoides* (kuopikka) kuuluu *Tylospora asterophoran* (tähtihumukka) lailla orvakoihin. Orvakat ovat pääasiassa kuollutta puuainesta lahottavia sieniä. Jotkin orvakkalajit toimivat myös mykorritsasieninä ja osa loisii elävissä puissa. Suomesta on löydetty kaikkiaan reilut 400 orvakkalajia. *Amphinema byssoides* ja *Tylospora*

*asterophora* havaittiin mm. Kivinokan alueella Helsingissä vuosien 2006 - 2007 aikana toteutetussa kartoituksessa. Alue on pääosin iäkästä tuoretta kuusikangasta ja valtaosa lahoppuusta on kuusta. [25, s. 2, 5–6, 11.]

Juova 26 eli luokittelematon *Russulaceae* (Uncultured Russulaceae isolate RDA2) esiintyi pelkästään tuhkakäsittelyssä näytteessä. Russulaceae on haperoiden ja rouskujen heimo ja *Russula* haperoiden suku. Monet haperot ovat hyviä ruokasieniä, eikä myrkyllisiä haperoita tiedetä löytyvän Suomesta. [26.]

Juova 33 eli *Penicillium citreonigrum* esiintyi kontrolli-, typpi-tuhka ja typpikäsittelyissä. Se on home, joka tuottaa citreoviridin-nimistä toksinia. Sitä on löydetty mm. riisistä sadonkorjuun jälkeen. [27.]

Vallitsevia, kaikissa näytteissä esiintyviä sienilajeja olivat juovien 13, 20, 14, 22 ja 41 kanssa samalla tasolla olevat juovat. Näistä suurin osa oli luokittelemattomia sieniklooneja (esimerkiksi Uncultured fungus clone C4 3B). Juovien 22 ja 41 perusteella lajit *Russula sp.* (H22) ja *Tomentella sp.* (D14) olivat vallitsevia, eivätkä lannoituskäsittelyt olleet vaikuttaneet niiden esiintymiseen.

Sienisekvenssien fylogeneettinen puukuvio (kuva 4) kertoo sekvenssien samankaltaisuudesta. Verrattaessa puukuvion juovien numeroita geelikuvan juoviin (kuva 2) huomattiin, kuinka yhtä pitkän matkan kulkeneet sekvenssit sijaitsivat myös puukuviossa lähekkäin. DGGE-analyysi oli siis hyvin onnistunut, koska ideana oli erotella eri DNA-jaksot toisistaan sekvenssiensä perusteella.

## 6.2 Bakteerit

Humusmaasta monistetun 16S rDNA -merkkigeenin DGGE-analyysissa juovia saatiin leikattua talteen ja lähetettyä sekvensoitaviksi 81 kpl. Suurin osa bakteerisekvensseistä oli kuitenkin päällekkäisiä, eli samaan näytteeseen oli monistunut useampaa sekvenssiä. Tämä johtui luultavasti MF341- ja MR907-alukkeiden herkkydestä monistaa eri DNA-jaksoja, huonosta erottelusta DGGE-geelillä tai kontaminaatiosta jossakin näytteenkäsittelyvaiheessa.

Humusmaan bakteerien DGGE-analyysin geelikuvan juovien perusteella piirrettyssä sormenjälkikuviossa (kuva 6) havaittiin melko vähän eroja eri lannoituskäsittelyiden välillä. Typpi-tuhkalannoituskäsittelyn juovat olivat samanlaiset kuin kontrollinäytteellä. Typpi- ja tuhkakäsittelyt muistuttivat puolestaan keskenään toisiaan.

Bakteerisekvenssejä tunnistettiin neljä: juovat 1, 40 sekä 79 ja 60, jotka olivat kulkeutuneet saman matkan. Suurin osa juovista oli luokittelemattomia maaperän bakteeriklooneja, jotka esiintyivät kaikissa humusmaalle tehdyissä lannoituskäsittelyissä.

Juova 60 tunnistettiin Acidobacteria-ryhmään kuuluvaksi. Koska juova 79 on samalla tasolla, se kuuluu luultavasti samaan ryhmään. Acidobacteria-ryhmä on löydetty monista eri ympäristöistä ympäri maailmaa. Koska ryhmä on monimuotoinen ja esiintyy runsaasti eri ympäristöissä, etenkin maaperässä, uskotaan sillä olevan tärkeä ekologinen rooli ja monimuotoinen aineenvaihdunta. Suurin osa Acidobacteria-ryhmän lajeista on kuitenkin luokittelemattomia, joten ryhmä kaipaa tarkempaa tutkimusta. [28, s. 563–564.]

### 6.3 Ammoniakkia hapettavat bakteerit (AOB)

Humusnäytteestä monistettiin 16S rDNA -merkkigeeniä paitsi bakteerien, myös AOB:n tunnistusta varten. AOB:n DGGE-analyysissa juovat olivat pilvimäisiä, eikä standardia saatu erottumaan kunnolla yhtenä juovana. Tämä johtui todennäköisesti DGGE-analyysia edeltävistä PCR-reaktioista, joissa haluttua tuotetta ei saatu monistumaan kunnolla ilman epäpuhtauksia. Juovia saatiin kuitenkin leikattua talteen ja sekvensoitua. Osassa AOB:n sekvenssejä oli päällekkäisyyksiä.

AOB:n DGGE-analyysin geelikuvan juovien avulla piirretyn sormenjälkikuvion perusteella (kuva 8) erot eri lannoituskäsittelyiden välillä humusmaassa ovat selvät. Eri lannoituskäsittelyiden juovat sijaitsevat erillään toisistaan, joten käsittelyillä on vaikutusta AOB:n lajistoon.

Suurin osa AOB-sekvensseistä tunnistettiin luokittelemattomiksi  $\beta$ -proteobakteereiksi (uncultured beta proteobacterium), kuten juovat 22, 23, 19, 39 ja 37. Juovat 22 ja 23 esiintyivät sekä typpi-tuhka- että tuhkanäytteessä. Juovat 19 ja 39 esiintyivät puolestaan vain typpi-tuhkanäytteessä. Juova 37 oli vallitseva typpi- ja tuhkakäsittelyissä. Suurin osa tunnistetuista sekvensseistä oli peräisin samasta julkaisusta, jonka mukaan valtaosa tutkimuksessa määritetyistä sekvensseistä kuului *Nitrosospira* sukuun ryhmiin 3a, 3b ja 4 [29, s. 227]. Onnistuneista sekvensseistä valtaosa siis lienee *Nitrosospira*-ryhmään kuuluvia.

Erilaisista AOB-sekvensseistä piirretyn fylogeneettisen puun (kuva 9) perusteella saman matkan kulkeneet sekvenssit sijaitsevat puussa lähekkäin. DGGE-analyysi oli siltä osin hyvin onnistunut, koska ideana oli erotella eri DNA-jaksot toisistaan sekvenssiensä perusteella.



Yleisesti tiedetään, että typpeä sisältävien lannoitteiden käyttö lisää ammoniakkia hapettavien populaatioiden määrää. Tutkimusten (esim. Prosser 1989) mukaan yleisin maaperänäytteistä löydetty AOB-laji kuuluu *Nitrosospira sp.* -ryhmään. [30, s. 168.] Uudempien tutkimusten mukaan (esim. Bothe 2000) *Nitrosospiran* kaltaisia AOB:ia on huomattu olevan kaikkialla, varsinkin luonnollisissa ympäristöissä. Myös *Nitrosomonaksen* kaltaisia AOB:ia on löydetty monista ympäristönäytteistä. Esimerkiksi lajeja *N. eutropha* tai *N. europaea* havaitaan helpommin näytteistä, joissa ravinteiden kuten typen määrä on lisääntynyt. Toisaalta tilanne ei ole yksiselitteinen, ja jotkut *Nitrosospira* kannat voivat pystyä kasvamaan korkeissa typpipitoisuuksissa. [8, s. 677–678; 30, s. 173.]

## 7 PÄÄTELMÄT

Työn tarkoituksena oli selvittää, onko typpi-, tuhka- ja typpi-tuhkalannoituskäsittelyillä vaikutusta metsämaan humuksen mikrobilajistoon. Tutkitut mikrobiryhmät olivat sienet, bakteerit ja ammoniakkia hapettavat bakteerit. Työ toteutettiin PCR- ja DGGE-menetelmillä sekä sekvensoinnilla. Kaikkien mikrobiryhmien DGGE-analyyseistä onnistuttiin sekvensoimaan ja identifioimaan eri fylyttyppejä. Työ oli siis onnistunut. Parhaat tulokset saavutettiin sienten osalta, joiden DGGE-analyysin juovat olivat terävimmät ja sekvenssit puhtaimmat. Bakteerien ja AOB:n osalta menetelmät kaipaavat vielä optimointia humusnäytteitä varten. Sekvensseissä oli myös epäpuhtauksia, joten työtavoissa ja -menetelmissä voi olla parannettavaa.

Metsämaan humuksen mikrobilajistoissa eri lannoituskäsittelyiden välillä havaittiin selviä eroja. DGGE-analyysien perusteella suurimmat erot olivat sieni- ja AOB-lajistoissa, joilla lajistot olivat kaikissa käsittelyissä erilaiset. Tulosten perusteella sieni- ja AOB-lajistot ovat herkimpiä lannoituskäsittelyiden vaikutuksille. Vähiten eroja oli bakteerilajistossa.

Tulevaisuudessa humusnäytteistä voitaisiin tutkia DNA:n lisäksi myös RNA:ta. Metsämaan RNA:n tutkiminen auttaisi selvittämään, mitkä mikrobit ovat toiminnallisia, mikä olisi mielenkiintoista etenkin metsämaassa toteutettuja lannoituskäsittelyitä verrattaessa.

## VIITELUETTELO

- [1] University of Helsinki, Lahti Soil Ecology Group. *Processes and organisms in nitrification*. [verkkodokumentti]. 2003-2004. [Viitattu 20.5.10.] Saatavissa: [http://www.helsinki.fi/ecology/lseg/processes\\_and\\_organisms\\_in\\_nitrification.html](http://www.helsinki.fi/ecology/lseg/processes_and_organisms_in_nitrification.html)
- [2] Strömmer, R., Müller, C. & Simojoki, A. *Nitrogen dynamics in a boreal spruce forest soil fertilized with ash and nitrogen* (julkaisematon).
- [3] Maljanen, M. ym. Methane and nitrous oxide fluxes, and carbon dioxide production in boreal forest soil fertilized with wood ash and nitrogen. *Soil Use and Management*, 22.6.2006 s. 151-157.
- [4] Paul, E.A. & Clark, F.E. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Second edition. USA: Academic Press. 1996.
- [5] Joensuun yliopisto, *Maa-aineksen koostumus* [verkkodokumentti]. [Viitattu 19.5.2010]. Saatavissa: [http://gis.joensuu.fi/~mhoito/kasvu/maa\\_aineksen.htm](http://gis.joensuu.fi/~mhoito/kasvu/maa_aineksen.htm)
- [6] Solunetti, *Sienet* [verkkodokumentti]. 2006. [Viitattu 21.5.2010.] Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sienet/>
- [7] Sylvia, D. ym. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Upper Saddle River, USA: Prentice Hall Inc. 1999.
- [8] Bothe, H. ym. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *Fems Microbiology Reviews* 24 (2000), s. 673-690.
- [9] Kurola, J. ym. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil. *Fems Microbiology Letters* 250 (2005), s. 33-38.
- [10] Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 2 (1999), s. 317-322.
- [11] Nakatsu, C. H. Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *SSSAJ* 2 (2007), s. 562-571.
- [12] Laboratory for Microbial Ecology Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences, University of Toledo. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)* [verkkodokumentti]. 12/2004. [viitattu 28.7.2010.] Saatavissa: <http://www.eeescience.utoledo.edu/faculty/sigler/research/protocols/dgge/dgge.pdf>
- [13] Nasonova, E.S. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, Instruments and Application. *Cell and Tissue Biology* 6 (2008), s. 557-565.
- [14] AFAC, A Nordic Research Network. *Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)* [verkkodokumentti]. 27.2.2003. [Viitattu 3.9.2010.] Saatavissa: [http://www-afac.slu.se/PhDcourse/t\\_rflp.pdf](http://www-afac.slu.se/PhDcourse/t_rflp.pdf)

- [15] Soikkeli, K. *DNA-pohjaisten menetelmien käyttö metsä- ja maatalousmaan pintakerroksen ammoniakkaa hapettavien bakteerien ja arkkien sekä sienten tutkimuksessa*. Opinnäytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Laboratorioalan koulutusohjelma. Helsinki. 2009.
- [16] Fabritius, A-L. & Koponen, H. *Tyrnin versolaikkutaudin leviämisbiologia ja testaus tyrnin lisäysaineistosta*. Maataloustieteen päivät 2004. Esitelmä- ja posterilyhennelmät. Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote no 20.
- [17] Shahid, M., Freitag, T.E. & Prosser, J.I. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. *Fems Microbiology Ecology* 3 (2006), s. 482-493.
- [18] Vilgalys Lab Duke University. *Internal transcribed spacer (ITS) region primers* [verkkodokumentti]. 2010. [Viitattu 7.7.2010.] Saatavissa: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>.
- [19] Korkama-Rajala, T., Müller, M.M. & Pennanen, T. Decomposition and Fungi of Needle Litter from Slow- and Fast-growing Norway Spruce (*Picea abies*) Clones. *Microbial Ecology* 1 (2008), s. 76-89.
- [20] Nykänen, A.M. ym. Reduction of Odorants on Swine Manure by Carbohydrate and Bacterial Amendments. *JEQ* 2 (2008), s. 678–685.
- [21] Puttonen, H. *Öljy-yhdisteillä pilaantuneen maan mikrobiston analysointi DNA-menetelmillä*. Opinnäytetyö. Lahden ammattikorkeakoulu. Lahti. 2009.
- [22] Kurola, J. ym. Application of cation-exchange membranes for characterization and imaging ammonia-oxidising bacteria in soils. *FEMS Microbiology Ecology* 53 (2005) 463-472.
- [23] *Fingerprint Analysis with Missing Data 1.2 Software* [verkkodokumentti]. 16.5.2010. [Viitattu 3.9.2010.] Saatavissa: <http://www.famd.me.uk/famd.html>
- [24] Zilberstein, M. ym. *Wilting disease of young avocado trees caused by Neonectria radicicola in Israel*. Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) [verkkodokumentti]. 2007. [Viitattu 14.9.2010.] Saatavissa: <http://www.avocadosource.com/WAC6/en/Extenso/2b-76.pdf>
- [25] Kiema, S. & Saarenoksa, R. *Kivinokan pohjoisen metsäalueen kääpä- ja orvakkainventointi 2006–2007*. Helsingin kaupungin ympäristökeskuksen julkaisuja 1/2009. Helsingin kaupungin ympäristökeskus. Helsinki. 2009.
- [26] Wikipedia, *Haperot* [verkkodokumentti]. 12.8.2010. [Viitattu 14.9.2010.] Saatavissa: <http://fi.wikipedia.org/wiki/Haperot>
- [27] Pitt, J.I. *Toxigenic aspergillus and penicillium species* [verkkodokumentti]. [Viitattu 14.9.2010.] Saatavissa: <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E08.HTM>

- [28] Quaiser, A. ym. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology* 2 (2003), s. 563–575.
- [29] Le Roux, X. ym. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *The ISME Journal* 2 (2008), s. 221–232.
- [30] Prosser, J.I. & Embley, T.M. Cultivation-based and molecular approaches to characterization of terrestrial and aquatic nitrifiers. *Advances in microbial physiology* 30 (1989), s. 125–181.